

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a crown on top, flanked by two figures. The shield is surrounded by a circular border containing the Latin text "LETTERAS ORTIZ CONSPICUA + CAROLINA ACADEMIA COACATEMALTENSIS INTER".

**“METODOLOGÍA DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO PARA EL  
YOGURT QUE SE COMERCIALIZA EN GUATEMALA. - Aporte  
parcial para la elaboración de una norma oficial guatemalteca para el  
yogurt.**

**MARGARITA ORTIZ ARCHILA DE ORTIZ**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**Guatemala, Abril de 2009.**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**“METODOLOGÍA DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO PARA EL  
YOGURT QUE SE COMERCIALIZA EN GUATEMALA. - Aporte  
parcial para la elaboración de una norma oficial guatemalteca para el  
yogurt.**

**INFORME DE TESIS**

**PRESENTADO POR**

**MARGARITA ORTIZ ARCHILA DE ORTIZ**

**Para optar al título de  
QUÍMICA FARMACÉUTICA**

**Guatemala, Abril de 2009.**

**JUNTA DIRECTIVA  
FACULTAD DE CIENCIA QUÍMICAS Y FARMACIA**

<b>DECANO</b>	<b>Oscar Cobar Pinto, Ph.D</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto</b>
<b>VOCAL I</b>	<b>Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.</b>
<b>VOCAL II</b>	<b>Licda. Liliana Vides de Urizar</b>
<b>VOCAL III</b>	<b>Lic. Luís Antonio Gálvez Sanchinelli</b>
<b>VOCAL IV</b>	<b>Br. Andrea Alejandra Alvarado Álvarez</b>
<b>VOCAL V</b>	<b>Br. Anibal Rodrigo Sevillanos Cambronero</b>

DEDICO ESTE ACTO

A DIOS

A MIS PADRES

RICARDO ORTIZ GARCIA  
CLARA LUZ ARCHILA PINEDA

A MI ESPOSO

JUAN FRANCISCO

A MIS HIJOS

JUAN FRANCISCO  
CARLOS AARON  
CLAUDIA MARGARITA  
MARIA RENEE

A MIS NIETOS

JUAN FRANCISCO  
GABRIELA ISABEL

A MIS HERMANOS

A

EL GRUPO LAS ARAÑITAS  
CRISTY JUAREZ  
MARICELA GARCÍA  
RUTH DE ORTIZ  
VIDAL ORTIZ  
MARTA ORTIZ  
ARTURO BRAN

DEDICO ESTA TESIS

A UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

A MIS COMPAÑEROS DE LAS PROMOCIONES 2004-2006

## AGRADECIMIENTO

A todas las personas que colaboraron para la realización de este trabajo, en especial a la Licenciada Ana Rodas de García, y a quienes me tendieron una mano desinteresada cuando por algún motivo requerí ayuda durante el tiempo que curse los estudios para la Licenciatura de Química Farmacéutica.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>1. RESUMEN</b>	<b>9- 10</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>12- 22</b>
3.1 Aspectos legales	
3.2 Aspectos teóricos	
3.3 Aspectos Metodológicos	
3.3.1 Evaluación organoléptica del yogurt.	
3.3.2 Evaluación fisicoquímica.	
3.3.3 Evaluación microbiológica.	
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>23</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>25</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>25-31</b>
7.1 Universo de trabajo.	
7.2 Materiales.	
7.3 Métodos.	
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>32-34</b>
8.1 Tabla No. 1: Contenido de organismos iniciadores: <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> y <i>Streptococcus salivarius</i> , subsp. <i>Thermophilus</i> )	
8.2 Tabla No. 2. Determinación de coliformes totales y <i>E. coli</i> .	
8.3 Tabla No. 3. Determinación de patógenos.	
8.4 Tabla No. 4. Determinación de hongos y levaduras.	
<b>9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>35-36</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>37</b>
<b>11. RECOMENDACIONES</b>	<b>38</b>
<b>12. REFERENCIAS</b>	<b>39-41</b>
<b>13. ANEXOS</b>	<b>42-65</b>

## 1. RESUMEN

El Yogurt es un tipo de producto lácteo tan antiguo como la humanidad misma, pues en el siglo 30. a.c. los sumerios ya lo utilizaban dentro de su dieta.

Actualmente el consumo de este tipo de producto lácteo se ha visto incrementado, ya que, las propiedades benéficas que se le atribuyen lo han hecho un tipo de producto de fácil comercialización entre todo tipo de población. Guatemala no ha escapado a este aumento en la demanda de yogurt.

En nuestro país es la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR), la entidad gubernamental encargada de elaborar las normativas para garantizar a la población que los productos que adquiere cumplan con los parámetros internacionales. De tal manera, que al consultar las normas vigentes, se estableció que no existe una norma específica para el yogurt en nuestro país, lo que dio lugar a la idea de hacer una revisión documental de los requisitos internacionales microbiológicos con que deba contar este producto lácteo y al mismo tiempo efectuar los ensayos propuestos para establecer que la metodología es funcional y factible de realizar.

El objetivo del presente estudio es entonces establecer las pruebas de análisis microbiológicas que deban realizarse al yogurt que se comercializa en nuestro país, y que el mismo sea un aporte parcial para la elaboración de la Norma Guatemalteca.

Al realizar las consultas pertinentes se pudo establecer que el análisis de control de calidad del yogurt comprende tres aspectos: Análisis sensorial, análisis fisicoquímico y análisis microbiológico. En el presente trabajo de investigación se llevaron a cabo únicamente los ensayos microbiológicos y en los anexos del trabajo se detalla la metodología para el análisis sensorial y fisicoquímico.

Los análisis de control calidad microbiológicos para el yogurt que se llevaron a cabo fueron los siguientes: Contenido de microorganismos iniciadores (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* y *Streptococcus salivarius*, subsp. *Thermophilus*), determinación de coliformes totales y *E.coli*, determinación de patógenos (*S. aureus*, *Salmonella sp*, *Shigella sp.*), determinación de hongos y levaduras; para todas las pruebas realizadas se contó con una muestra positiva para los microorganismos a analizar, que se tomó como patrón de comparación y en la sección de resultados se presentan en forma de tabla con las especificaciones que las normativas consultadas exigen para cada una en particular, así mismo, en la sección de anexos se incluyen las marchas bacteriológicas bien detalladas, mismas que contribuirán a realizar los ensayos a quien desee realizarlo.

Como conclusión podemos entonces decir, que la hipótesis planteada se cumplió, pues los ensayos microbiológicos llevados a cabo en una muestra de yogurt fueron factibles de realizar y son funcionales para el uso que se propone en el presente trabajo de



investigación.

Sirva entonces el presente trabajo como un aporte parcial para poder elaborar la Norma Guatemalteca del Yogurt, y como constancia de la contribución que los trabajos de investigación realizados por la Facultad de Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, dan a la población Guatemalteca, y con el mismo contribuyen al desarrollo de nuestro país.

## 2. INTRODUCCIÓN:

El yogurt, es un producto lácteo tan antiguo como la leche misma; su consumo ha tenido un incremento muy notable en los últimos años. El aumento en el consumo se ha debido a diversos factores, entre los que se mencionan: dietas saludables o bajas en grasa e intolerancias a lactosa de la leche.

Sea entonces, por moda o por prescripción médica, este aumento en el consumo del yogurt, ha obligado a las autoridades de cada país, a establecer parámetros de calidad para proteger a la población de posibles daños a la salud si este producto no es elaborado siguiendo las normas mínimas de control de calidad, para ser considerado como seguro para el consumo humano.

El codex alimentarius, compilación de normas internacionales para alimentos, de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la FAO, incluye en su contenido, los requerimientos de calidad necesarios para el yogurt.

En Guatemala, el consumo de yogurt se ha incrementado en los últimos años; existiendo en nuestro país normas para los productos lácteos en general, dentro de los que se cita al yogurt; pero, no existe una norma específica para este producto; existiendo si, una Norma Centroamericana del Yogurt, redactada por el Instituto Centroamericano de Ciencia y Tecnología (ICAITI) en el año 1978, pero la misma no ha sido tomada en todo su contexto para el Análisis de Control de Calidad de este producto lácteo en nuestro país.

Es importante que en Guatemala se cuente con una norma de aplicación obligatoria que detalle o especifique las pruebas de control de calidad con las que debe cumplir este tipo de producto lácteo, para garantizarle a la población que lo consume, que el mismo no representa un riesgo para su salud, y que por el contrario le aportará un beneficio nutricional

El presente trabajo de investigación es un aporte parcial en esa línea, pues pretende establecer una metodología mínima de análisis y especificaciones de control de calidad microbiológico, que deba cumplir el yogurt que se comercializa en la República de Guatemala, para presentarlo como una propuesta parcial a la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 ASPECTOS LEGALES:

La Constitución Política de la República de Guatemala, en el título I, capítulo único, artículo 1 dice: **Protección de la persona.** El estado de Guatemala se organiza para proteger a la persona y a la familia, su fin supremo es la realización del bien común. Por otro lado en el Código de salud vigente, Decreto de estado número 90-97, el cual fue creado para proteger a la persona y a la familia, y siendo el goce de la salud derecho fundamental del ser humano, sin discriminación alguna, y obliga al estado a velar por la misma, desarrollando a través de sus instituciones, acciones de prevención, promoción, recuperación y rehabilitación, a fin de procurarles a los habitantes el más completo bienestar físico, mental y social, reconociendo asimismo, que la salud de los habitantes de la nación es un bien público dice en el título único, capítulo I, Artículo 1: **Del derecho a la salud.** Todos los habitantes de la república tienen derecho a la prevención, promoción, recuperación y rehabilitación de su salud, sin discriminación alguna. Artículo 2: **Definición:** la salud es un producto social resultante de la interacción entre el nivel de desarrollo del país, las condiciones de vida de las poblaciones y la participación social, a nivel individual y colectivo, a fin de procurar a los habitantes del país el más completo bienestar físico, mental y social (1, 2).

En este mismo código en el capítulo V, Alimentos, establecimientos y expendios de alimentos, sección I, de la protección de la salud en relación con los alimentos, dice en el **artículo 124: Definición:** Alimento es todo producto natural, artificial, simple o compuesto, procesado o no, que se ingiere con el fin de nutrirse o mejorar la nutrición, y los que se ingieren por hábito o placer, aún cuando no sea con fines nutritivos; y también en el **artículo 127. Otras definiciones.** Para los efectos de este código y sus reglamentos, en sus incisos b y e se entiende por: a) alimento natural procesado, todo producto alimenticio elaborado a base de un alimento natural que ha sido sometido a un proceso tecnológico adecuado para su conservación y consumo ulterior y e) alimento para regímenes especiales, aquel que se ha elaborado con el fin de satisfacer regímenes nutricionales especiales, sean estos por razones metabólicas, estéticas o fisiológicas y todos aquellos que se ingieran como suplemento nutricional (2).

También en este mismo código en sus **artículos 128. Del derecho de la población.** Todos los habitantes tienen derecho a consumir alimentos inocuos y de calidad aceptable. Para tal efecto el ministerio de Salud y demás instituciones del Sector, dentro de su ámbito de competencia, garantizarán el mismo a través de acciones de prevención y promoción; **129. Formulación de políticas y programas.** El ministerio de salud en coordinación con las demás instituciones del Sector, será el responsable de formular las políticas y estrategias

relacionadas con la protección e inocuidad de los alimentos. En este contexto se crea el programa nacional de alimentos, con la participación de los ministerios con responsabilidad en el control de alimentos., de las municipalidades, del sector privado y otras organizaciones que representen a los consumidores, creando mecanismos que aseguren la coordinación institucional y **130. Ámbito de las responsabilidades.** El ministerio de salud y otras instituciones de manera coordinada desarrollan diversas funciones y entre las que interesan al presente trabajo están: incisos a) Al ministerio de salud le corresponden las de prevención y control en las etapas de procesamiento, distribución, transporte y comercialización de alimentos procesados de toda clase, nacionales o importados (2).

La república de Guatemala, cuenta también con LA LEY DE PROTECCIÓN AL CONSUMIDOR Y USUARIO, que fue creada para la defensa de consumidores y usuarios para garantizar la salud, seguridad y legítimos intereses económicos de los usuarios; y Guatemala adquirió el compromiso de aplicar y cumplir las directrices para la protección del consumidor aprobadas por la Asamblea General de la organización de Naciones Unidas, y esta define el quehacer de los gobiernos para la concreción de una efectiva protección y salvaguarda de los derechos e intereses legítimos de los consumidores y esta ley cita en el capítulo I, disposiciones generales, artículo1: Objeto. Esta ley tiene por objeto promover, divulgar y defender los derechos de los consumidores y usuarios, establecer las infracciones, sanciones y los procedimientos aplicables en dicha materia. Las normas de esta ley son tutelares de los consumidores y usuarios y constituyen un mínimo de derechos y garantías de carácter irrenunciable, de interés social y de orden público (3).

Esta misma ley en el capítulo II, Consumidores, usuarios y proveedores, sección I, Derechos de los consumidores y usuarios, en el inciso a), establece: la protección a su vida, salud y seguridad en la adquisición y uso de bienes y servicios (3).

Por otro lado, la obligación del Estado de Guatemala de velar por la salud de sus habitantes, lo ha llevado a la elaboración de normar sanitarias, a través del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Departamento de Regulación, vigilancia y control de la salud, Departamento de regulación y control de alimentos, que ha establecido la NORMA SANITARIA PARA LA AUTORIZACIÓN Y CONTROL DE FÀBRICAS PROCESADORAS DE LECHE Y PRODUCTOS LACTEOS, que establece en el artículo 30, inciso 4.6: ELABORACIÓN DE PRODUCTOS LÀCTEOS: que la elaboración debe ser supervisada por personal técnicamente competente, y cita además las condiciones en las cuales se debe llevar a cabo el proceso, y los requisitos que debe llenar una fábrica de este tipo de producto, entre los que se encuentra el yogurt ( 4).

Esta misma norma siempre en el artículo 30, inciso 4.12, PROCEDIMIENTOS

DE MUESTREO Y CONTROLES DE LABORATORIO, establece las condiciones para realizar estos controles y los procedimientos a seguir, observando la metodología de análisis de laboratorio, ajustada a métodos normalizados en Guatemala, y otros reconocidos internacionalmente; este mismo artículos cita que debe evitarse que los ingredientes o el producto terminado se contaminen con agentes patógenos procedentes del laboratorio, la designación de una persona debidamente capacitada y con experiencia que se encargue de la aplicación apropiada de los procedimientos de muestreo y ensayo (4).

## 3.2 ASPECTOS TEÓRICOS:

### 3.2.1 GENERALIDADES:

Definición: El yogurt es un producto obtenido a partir de la leche, entera o descremada, habitualmente de vaca, aunque a veces se elabora con leche de cabra o de oveja, higienizada o de una mezcla higienizada de esta con derivados lácteos, fermentada por la acción de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* y *Streptococcus salivarius*, subsp. *Thermophilus*, los cuales deben ser viables, abundantes y activos hasta el final de su vida útil, y de cuya fermentación debe resultar un líquido suave y viscoso, o un gel suave y delicado, de textura firme, uniforme, con la mínima sinéresis y con sabor característico (5, 6, 7).

La fermentación para prolongar la vida útil de la leche probablemente sea tan antigua como la propia explotación del ganado lechero. Se cree que las cabras y las ovejas fueron los primeros animales en ser domesticados en el Oriente próximo allá por los años 900 a. C. Las leches fermentadas, que incluyen el yogurt, el suero de mantequilla, la leche ácida y el kéfir, productos de consistencia semisólida en los que el fenómeno más importante es la transformación de la lactosa de la leche en ácido láctico u otros componentes debido a la acción de microorganismos específicos que se inoculan en la leche; se diferencian del queso en que en su elaboración no se utiliza cuajo y en que el espesamiento que se produce es el resultado de la acidificación por bacterias ácido lácticas. La formación de ácido láctico produce una acidificación que modifica el estado coloidal en el que se encuentran las proteínas de la leche, formando un coágulo que es el responsable de la consistencia característica final. Además de la transformación de la lactosa, se producen fenómenos de proteólisis y lipólisis por acción microbiana y enzimática, que confieren a los derivados unas determinadas características nutricionales y que también determinan su aroma, sabor y consistencia (8,9).

El yogurt, cuyo nombre deriva del vocablo turco jugurt, es la leche fermentada que más abunda hoy día en el mundo occidental donde su popularidad deriva más de su sabor y de su versatilidad que de sus propiedades de conservación (8).

Los cultivos de yogurt pueden presentar problemas de crecimiento lento o incluso nulo, debido a la presencia de antibióticos en la leche; por lo tanto, el primer requisito previo de cualquier leche que deba ser utilizada en un proceso de fermentación es que, debe estar exenta de agentes antimicrobianos. Estos podrían ser restos de antibióticos segregados en la leche como consecuencia de la quimioterapia de la mastitis o de desinfectantes aportados a la leche por sistemas inadecuados de limpieza de los utensilios en la granja o en la lechería. La inhibición del cultivo iniciador no sólo podría ocasionar pérdidas económicas, sino que posiblemente permitiría que creciesen organismos patógenos (8, 10).

Existen evidencias que ciertas bacterias específicas usadas en la fermentación de productos de consumo diario como el yogurt, catalogadas como microflora intestinal sana, poseen altas propiedades antipatogénicas y antiinflamatorias. Estos microorganismos están asimismo, involucradas con una alta resistencia a la colonización de bacterias patógenas en el intestino, lo cual ha dado paso para introducir una novedosa intervención terapéutica y profiláctica basada en el consumo de productos cultivados con microorganismos vivos llamados probióticos, definiéndose probióticos como microorganismos vivos cuya ingestión en número suficiente es saludable y nutritivo; siendo el yogurt uno de los productos llamados probióticos (11, 12).

Existen tres tipos principales de yogurt: firme, batido y líquido, aunque se pueden mencionar algunos otros como congelado, deshidratado, etc., cada uno de ellos en forma natural o adicionada con sabores o con fruta. Los tipos de yogurt rígido y batido tienen alto contenido en sólidos (14 a 18 %) y en lo único que varían es en el proceso de elaboración. Por lo general, para aumentar el contenido de sólidos, el aumento de concentración se hace por evaporación, ósmosis inversa, ultrafiltración y adición de leche descremada en polvo (libre de inhibidores y Low Heat) (8,13, 14, 15).

Su composición incluye diversos componentes; siendo el principal responsable del sabor el acetaldehído (etanal), por lo que para darle el sabor correcto al yogurt debe estar presente en concentraciones de 23-41 mg/kg ( pH 4.2-4.4). Su acumulación es consecuencia del hecho de que ambas bacterias carecen de la enzima alcohol deshidrogenasa, por lo cual son incapaces de transformar el acetaldehído en etanol (8, 16, 17, 18).

Las personas que sufren de intolerancia a la lactosa no presentan síntomas cuando consumen yogurt, principalmente si consume yogurt entero en lugar de desgrasado, a pesar de que este producto puede contener hasta 5.75 % del disacárido; ayudando en la digestión de lactosa, pues, su consumo reduce la producción de gas, ya sea que se consuma sólo o que se incluya carne durante su ingestión; siendo la razón probablemente que las mismas bacterias suministran la lactasa necesaria para la hidrólisis del azúcar aún dentro del tracto intestinal del consumidor (12, 19, 20).

La fermentación ácida láctica, el proceso responsable de la producción de

productos lácteos fermentados entre los que se incluye el yogurt, es una de las vías tradicionales de conservación de la leche, y el consumo del yogurt ha sido considerado por largo tiempo como benéfico para la salud humana. Metchnikof (1908) propuso que la longevidad de los búlgaros era en parte debido al rutinario consumo de yogurt. Estudios epidemiológicos y en animales, ha demostrado también, que los productos lácteos fermentados producidos con bacterias ácido lácticas, reducen la incidencia de tumores. Algunas bacterias ácido lácticas han mostrado ser antagonistas de microorganismos putrefactores del intestino por introducción de un ambiente ácido, alterando la flora intestinal, reduciendo compuestos mutagénicos en el intestino y estimulando a los responsables de la inmunidad de la mucosa. Por otro lado, algunos componentes de la leche como el calcio, vitamina D, vitamina A y ácido linoléico conjugado, han mostrado jugar un papel como preventivos de cáncer (21, 22).

Estudios sobre *Helicobacter pilory* una bacteria Gram negativa, que puede colonizar el epitelio del antrum estomacal y que sobrevive en ambientes ácidos, bacteria también reconocida como causante de gastritis crónica, asociado como un factor importante en el apareamiento de úlcera péptica estomacal; así mismo considerado un factor de riesgo en el apareamiento de enfermedades gástricas malignas como linfomas y adenocarcinomas gástricos, demostraron que el consumo durante 6 semanas de una preparación de yogurt conteniendo variedades de bacterias probióticas, fueron efectivas para suprimir la infección debida a esta bacteria; así mismo se ha demostrado que, el consumo crónico de yogurt de cultivos de bacterias vivas, disminuyen la mala digestión en personas con mal absorción de lactosa, pacientes en los cuales el consumo de yogurt fresco incrementa la producción de butirato y propionato, lo cual puede disminuir el metabolismo de glucosa y lípidos por largo tiempo, siendo por esto mismo beneficioso en personas que no muestran mala absorción a la lactosa ( 23, 24, 25, 26 ).

### **3.2.2 ESPECIFICACIONES Y ADITIVOS:**

Contenido de grasa: El contenido de grasa, adecuadamente homogenizada tratándose de yogurt entero, tiene una importante contribución en la viscosidad, textura y apariencia de producto y coayuda a evitar la sinéresis. El codex alimentarius especifica un contenido mínimo de grasa e 3 % para el producto entero y menos de 0.5 % para el yogurt descremado. (5, 6, 7, 14, 18, 27, 28).

Sólidos no grasos: El contenido mínimo de sólidos no grasos de la leche es variable, pero nunca debe de ser menor de de 8.5 %, pues, de lo contrario, puede tener una consistencia demasiado suave y una estructura del gel muy débil. La concentración de sólidos también tiene una relevancia nutricional, concentrándose la leche hasta un contenido de sólidos totales de 15-18% (5, 6, 7, 14, 18, 27, 28).

Acidez: El pH va de 3.7- 4.7 y la acidez varía de 0.8 a 1.4 % expresada como ácido láctico (5, 6, 7, 8, 14, 28).

Edulcorantes: El alto nivel de acidez del yogurt natural no es del agrado de muchos consumidores; por esta razón, frecuentemente se le añaden agentes edulcorantes de los cuales el más utilizado es la sacarosa, aunque también se utilizan miel de abeja, jarabe de maíz y edulcorantes dietéticos como el aspartame y la sacarina. Una posibilidad importante es la utilización de la enzima lactasa, la cual hidroliza la lactosa en sus dos componentes más dulces: glucosa y galactosa sin aumentar el valor calórico del producto. Según el Codex para leches fermentadas aromatizadas, el contenido de ingredientes no lácteos, será de un máximo de 50 % m/m; y según la Norma Centroamericana para el yogurt, como sustancias edulcorantes sólo se permitirá el agregado de azúcar blanco sin refinar, azúcar refinado y miel de abejas (5, 6).

Saborizantes y colorantes: los sabores utilizados son miel, vainilla, café, sabores de frutas, etc. y los colores permitidos por la FDA (5, 6, 7, 14, 29).

Frutas: los yogures de frutas se elaboran con mermeladas, pulpas, jarabes y fruta fresca. La fruta se puede adicionar primero en el fondo del envase para el yogurt tipo rígido o puede mezclarse con el producto para la elaboración del yogurt tipo batido o líquido (14, 29, 30).

Estabilizantes: En algunos países el uso de estabilizantes no está permitido; sin embargo, su uso confiere mayor estabilidad al producto ya que mejora el cuerpo, la textura, la sensación táctil en la boca y la apariencia del yogurt, ya que evita la ruptura del gel y la consecuente sinéresis (separación del suero). Los estabilizantes a usar deben ser seleccionados cuidadosamente para obtener las propiedades deseadas en el yogurt, ya que, distintos estabilizantes tienen diferentes propiedades. Por lo general, se utilizan mezclas de estabilizantes para obtener los resultados esperados. Algunos de los estabilizantes usados son pectina, gelatina, carragenina, alginatos, goma guar, goma de algarrobo, almidones y féculas, etc. (14, 27, 30).

Actualmente se utilizan cepas de bacterias de *Lactobacillus bulgaricus* y *S. thermophilus* productores de gomas que son de naturaleza glucosídica o glucoprotéica con lo cual se elimina la utilización de estabilizantes (14).

Para evitar que el producto sea de consistencia arenosa debido a las proteínas desnaturalizadas, la leche debe ser deshidratada a bajas temperaturas (Low Heat) o cuando menos debe ser Medium Heat, pero nunca High Heat (14).



### 3.2.3 MICROBIOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN:

*Lactobacillus delbrueckii* ss. *Bulgaricus* es un bacilo homofermentativo grampositivo, largo, no móvil, el cual produce ácido D – (-) láctico. Es capaz de fermentar fructosa, galactosa, glucosa y lactosa, pero no así maltosa y sacarosa. Puede crecer a temperaturas superiores a 45 °C, pero normalmente tiene su óptimo crecimiento entre 40 y 43 °C, no es capaz de crecer a temperaturas menores de 15 °C. Tiene la habilidad de crecer a pH inferiores a 5.0, y presenta metabolismo fermentativo aun en presencia de aire. En tanto, *Streptococcus salivarius* ss. *Thermophilus* es una bacteria grampositiva, esférica, la cual se observa en pares o en cadenas, es homofermentativo y produce ácido l – (+) láctico a partir de glucosa, fructosa, lactosa o sacarosa. Tiene una temperatura óptima de crecimiento de 40 a 45 °C, aunque puede crecer hasta 50 °C, pero no a menos de 20 °C. Se ha reportado para ambas bacterias que su temperatura óptima de crecimiento es inferior de 2 a 8°C a la temperatura óptima para la producción de ácido láctico en leche, que es quien proporciona los requerimientos nutricionales complejos. (15, 31, 32, 33, 34)

Ambas bacterias transforman la lactosa a ácido láctico, con la formación de pequeñas cantidades de otros metabolitos. El ácido láctico es el responsable de la formación del coágulo, firmeza y sabor ácido característicos del yogurt. Esta acidez también inhibe el crecimiento de otras bacterias, por ejemplo, las patógenicas *Salmonella* y *S. aureus*, y algunos microorganismos que deterioran el producto. *L. Dellbrueckii* ss. *bulgaricus* produce además peróxido de hidrógeno, bulgaricano y otro biocida de naturaleza no proteica, los cuales también inhiben el crecimiento de algunos microorganismos indeseables; así mismo, numerosos estudios sugieren los beneficios terapéuticos de las bacterias productoras de ácido láctico para un intestino saludable. Se ha observado también, que *Campylobacter jejuni* y *E. coli* son incapaces de sobrevivir en el yogurt. La actividad de los cultivos lácticos es muy importante en los procesos lácteos ya que de ésta depende en gran parte el tiempo de proceso y la detección de contaminantes. (35, 36, 37, 38, 39, 40, 41).

### 3.2.4 FACTORES DE CALIDAD:

La calidad se define como la importancia o cualidad de una cosa. El control de calidad por lo tanto, son los pasos o procedimientos para determinar si un objeto, producto, etc. posee la calidad que se le atribuye.

Al evaluar la calidad de un alimento es necesario determinar la presencia de microorganismos, compuestos tóxicos, otros contaminantes, etc. existiendo normas para ello. Un rubro importante es la sanidad para delimitar en lo posible, la presencia de microorganismos y toxinas que causen daño en el consumidor y/o el deterioro del alimento, y también otros procesos para garantizar la calidad de un producto. El yogurt no es la excepción, y para garantizar la calidad, es necesario seguir varios pasos antes y después del

proceso de fermentación.

#### **2.2.4.1 Acondicionamiento de la leche:**

El primer paso en la manufactura de este producto es la pasteurización de la leche. Este paso tiene como objeto eliminar la flora asociada a la leche, dejando así un medio adecuado para el cultivo de las bacterias del yogurt, libre de competidores y microorganismos indeseables; para a continuación realizar el proceso de producción como se explica a continuación:

A) Ajuste de sólidos: Este se realiza por diferentes métodos dependiendo de la materia prima, si es leche bronca o descremada; para aumentar sólidos no grasos (mayor a 8.5 % existente en la leche recién ordeñada) y la forma más sencilla de conseguir este incremento consiste en la adición de leche desnatada en polvo o de leche entera en polvo dependiendo de que se necesite un producto convencional o un producto pobre en grasa (14, 18, 29, 35, 43, 44, 45)

B) Tratamiento térmico: Antes de la adición del cultivo iniciador la leche es calentada a 80 – 90 grados centígrados entre 10 y 30 minutos, con lo cual se eliminan prácticamente los organismos contaminantes de la leche, se eliminan los inhibidores de crecimiento como las lacteninas, se desnaturalizan las proteínas solubles (lactoalbúminas y lactoglobulinas) formando compuestos, sulfhidrilos, péptidos, aminoácidos libres y disminuir el potencial de óxido reducción. El calentamiento también favorece reacciones mutuas entre las proteínas séricas, o proteínas del suero de la leche, y la caseína que aumentan la viscosidad del producto, estabilizan el gel y limitan la sinéresis (14, 18, 35, 44, 45, 46).

C) Homogenización: Si se deja reposar, la grasa de la leche se separa para formar una capa de nata. Para evitar esto, la leche es homogenizada obligándola a pasar a presión, típicamente a 100-200 kg /cm a 50 – 60 grados centígrados, a través de un pequeño orificio con el fin de reducir el tamaño de los glóbulos de grasa a un tamaño menor a 2 milimicras. La homogenización mejora la estabilidad del producto, aumenta la viscosidad de la leche y también contribuye a que parezca más blanca a medida que aumenta el número de núcleos que reflejan la luz (18, 43, 47).

D) Aditivos: Los estabilizantes y la base del yogurt que contiene el color, saborizante y edulcorante, generalmente se adicionan durante el ajuste de sólidos; y en el caso de la fruta el agregado dependerá del tipo de proceso que se utilice (18).

E) Fermentación: la temperatura de fermentación que se utiliza es de 45 a 48 grados centígrados, para obtener una acidez de 0.9 a 1.1 % como ácido láctico; otras literaturas reportan 0.8 a 1.4 % como ácido láctico y un pH entre 3.7 y 4.6; un tiempo de 2.5 a 3 horas, utilizando

el 3 % de inóculo como iniciador el cual contiene las bacterias lácticas *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en relación de 1:1. Terminada la fermentación y efectuadas las operaciones para obtener el producto terminado y envasado, este se debe mantener en refrigeración unas 24 horas a una temperatura de 3 a 5 grados centígrados para afirmar la consistencia del gel antes de su comercialización (18, 29, 43, 44).

F) Envasado y conservación: Generalmente los envases utilizados para el yogurt son de poliestireno, los cuales reúnen las condiciones sanitarias para la conservación del producto. Cuando la fermentación es completa, el yogurt se enfría hasta 15 – 20 grados centígrados antes de la adición de frutas y de los sabores y antes del envasado. El yogurt se conserva en buenas condiciones sanitarias para su consumo de 3 a 5 semanas, siempre que se mantenga en condiciones de refrigeración (De 3 a 5 grados centígrados). El yogurt no se debe pasteurizar puesto que el almacenamiento bajo refrigeración detendrá el crecimiento de los organismos del cultivo iniciador. Sin embargo, durante el almacenamiento la acidez seguirá aumentando lentamente (18, 48)

G) Microorganismos: Por su acidez y su pH bajo (habitualmente 3.8 – 4.2), el yogurt es un medio hostil para los organismos patógenos, los cuales no crecerán ni sobrevivirán adecuadamente. El yogurt es alterado por organismos ácidoúricos tales como levaduras o mohos. Las normas consultivas relativas a la calidad microbiológica han indicado que un yogurt satisfactorio debe contener más de 10 a la ocho ufc/gramo de organismos del cultivo iniciador, menos de 1 coliforme/gramo, cero colonias de Salmonella, *S. aureus*, menos de 1 moho/gramo y menos de 10 levaduras/gramo (es posible que el yogurt que contiene fruta contenga hasta 100 levaduras/gramos y siga siendo de calidad satisfactoria) (48).

La Salmonella y la Shigella se consideran potencialmente patógenas para el hombre; aunque las normas consultadas indican que el género Shigella no es investigado en el yogurt, no así el género Salmonella que si investiga. Estos microorganismos no se encuentran inicialmente en los alimentos, pero puede ingresar a los mismos a través de personas portadoras, resisten temperaturas de 25 grados centígrados e inferiores. El tiempo de sobrevivencia varía según el alimento de que se trate. No se usan mucho las técnicas serológicas para identificación en los laboratorios de microbiología de alimentos (48).

Estafilococos: Pertenecen a la familia de los *Micrococaceae* y se distinguen tres especies: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y *Staphylococcus saprophyticus*. Son cocos de 0.5-1 micras de diámetro, agrupados en racimos, son Gram positivos, no móviles. Crecen bien en cultivos ordinarios en condiciones aerobias, forman colonias grandes y cremosas de 13 mm. Para su aislamiento se usan

medios que contengan inhibidores para otras bacterias, como cloruro de sodio al 7.5% (Medio Champan) o bien el telurito potásico (Medio Baird-Parker). Estas bacterias pueden producir pigmentos carotenoides, de ahí la denominación de aureus, citreus y albus, según el color de cada colonia. El análisis de estafilococos se efectúa por dos razones fundamentales: 1. Intoxicación alimentaria por alimentos y 2. El riesgo de la formación de toxinas. *Staphylococcus aureus* es un buen indicador de los métodos de limpieza y desinfección usados en la industria de los alimentos. La presencia de *Staphylococcus aureus* en un alimento por sí sola no es la causa de un brote de intoxicación alimentaria. Es conveniente demostrar la presencia de otras enterotoxinas. En alimentos manipulados contaminados el periodo de incubación será menor a cuatro horas después de la ingestión (diarreas, deshidratación y vómitos). La presencia de *S. aureus* en ciertos alimentos reviste importancia por tratarse de un microorganismo parásito del hombre y animales superiores y por su capacidad para producir, en determinadas condiciones, una poderosa enterotoxina. Cuando se pone de manifiesto en algún alimento, se puede asociar este hecho con una exposición a la contaminación por humanos durante su manejo y de modo eventual a una contaminación de origen si el animal de donde proviene el alimento sufría alguna infección piógena. La situación adquiere mayor significado cuando el número encontrado de microorganismos es superior a 100 por mL o gramo de alimento, y se trata además de cepas coagulasa positiva. Esta última circunstancia da al microorganismo un riesgo especial pues se sabe que todas las cepas formadoras de enterotoxinas coagulan el plasma (14).

Hongos y levaduras: Los hongos tienen un pH más bajo que la mayoría de las bacterias. Además, tanto las levaduras como los hongos precisan para su crecimiento cifras de actividad acuosa mucho menores que las bacterias. Las necesidades nutritivas de la mayor parte de los hongos son sencillas toda vez que pueden crecer en medios de sales inorgánicas, con la condición de encontrar en los medios, carbohidratos, como fuente de energía. Sin embargo, algunos hongos precisan vitaminas- especialmente el complejo B- así como otros factores de crecimiento, que generalmente se aportan al suplementar el medio con 0.1% de extracto de levadura (48).

### **3.3 ASPECTOS METODOLÓGICOS:**

El análisis de control de calidad del yogurt comprende tres aspectos relevantes que son Evaluación organoléptica, Análisis Físicoquímico y Análisis Microbiológico, tomando como base la revisión de normas de otros países como Colombia, México y la Norma Centroamericana del Yogurt, elaborada por el ICAITI.

A continuación se enumeran las pruebas necesarias que deben realizarse al yogurt según la bibliografía y normas consultadas, experimentalmente se realizaron las pruebas microbiológicas, en los anexos del trabajo se incluye la metodología para el Análisis organoléptico y Físicoquímico.

**3.3.1 Evaluación organoléptica del yogurt: (5, 6, 7, 14, 48).**

- 3.3.1.1 Aspecto: uniforme, liso brillante, consistencia
- 3.3.1.2 Sabor: Grado de acidez
- 3.3.1.3 Olor

**3.3.2 Evaluación físicoquímica: (5, 6, 7, 14, 48, 49, 50).**

- 3.3.2.1 Acidez como ácido láctico.
- 3.3.2.2 Contenido de grasa
- 3.3.2.3 Sólidos totales y sólidos no grasos
- 3.3.2.3 Reducción de azul de metileno.
- 3.3.2.5 Prueba de la fosfatasa alcalina.

**3.3.3 Evaluación microbiológica: (5, 6, 7, 8, 14, 48, 51).**

- 3.3.3.1 Contenido de microorganismos iniciadores.
- 3.3.3.2 Determinación de organismos coliformes.
- 3.3.3.3 Determinación de patógenos: *S. aureus*, *Salmonella sp.* y *Shigella sp.*
- 3.3.3.4 Determinación de hongos y levaduras.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

El yogurt un producto cuyo consumo se ha visto incrementado en nuestro país, y cuya producción, si no se realiza con cuidado, puede dar lugar a contaminaciones que afecten a quien lo consume. Nuestro país carece en la actualidad de una Norma Oficial para este tipo de producto lácteo, siendo importante aportar una propuesta al estado de Guatemala, para la protección de la salud de sus habitantes. La ausencia pues, de una norma específica para este tipo de producto lácteo, justifica llevar a cabo esta investigación, la cual propone las pruebas microbiológicas mínimas necesarias que deban realizársele, así como los rangos permitidos para cada parámetro, para considerarlo como seguro y apto para consumo humano, y de esta forma contribuir parcialmente a elaborar la Norma Oficial Guatemalteca.

Guatemala, en el Tratado del Libre Comercio que se firmó durante el año 2006 con Estados Unidos de América, República Dominicana y el resto de países de Centroamérica, se compromete a propiciar una política de mejoramiento en las metodologías analíticas existentes. De esta cuenta, el implementar una Norma Oficial para el yogurt, garantizaría que este proceso se lleve a cabo y permitiría que el sector industrial del yogurt sea competitivo a nivel internacional. De este modo también se generaría una fuente de trabajo permanente pues se necesitaría personal calificado para realizar los análisis bacteriológicos a este tipo de producto lácteo, y se lograría la confianza y seguridad para el consumidor guatemalteco y de los países a donde se exporte el yogurt producido en Guatemala.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Generales:**

- 5.1.1 Establecer una metodología de análisis microbiológico para el yogurt que se comercializa en Guatemala.
- 5.1.2 Contribuir parcialmente a la elaboración de la Norma Oficial Guatemalteca para el yogurt.

### **5.2 Específicos:**

- 5.2.1 Determinar por medio de una revisión documental las pruebas de control de calidad microbiológicas que se deban realizar al yogurt para considerar este como un producto adecuado para el consumo humano.
- 5.2.2 Describir las monografías de las pruebas para realizar el control de calidad microbiológico para el yogurt.
- 5.2.4 Determinar mediante una revisión documental las especificaciones de cada parámetro a evaluar.
- 5.2.5 Comprobar experimentalmente que las pruebas propuestas para el control de calidad microbiológico del yogurt que se comercializa en la República de Guatemala, son factibles de realizar.

## **6. HIPÓTESIS**

Las pruebas propuestas para evaluar la calidad microbiológica del yogurt que se comercializa en la República de Guatemala, son funcionales y realizables a todo tipo de yogurt.



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Universo de trabajo:

- 7.1.1 Norma Guatemalteca para productos lácteos.
- 7.1.2 Norma Centroamericana para el Yogurt.
- 7.1.3 Norma Colombiana para el yogurt.
- 7.1.4 Normas ISO para productos lácteos.
- 7.1.5 FDA Bacteriological Analytical Manual (AOAC)
- 7.1.6 Cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella sp.*, proporcionadas por El laboratorio de Análisis Fisicoquímicos y Microbiológicos (LAFYM), de la Facultad de Ciencia Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- 7.1.7 Muestra de Yogur comercial, tipo natural.

### 7.2 Materiales:

- 7.2.1 Beakers,
- 7.2.2 Earlenmeyers
- 7.2.3 Probetas
- 7.2.4 Pipetas serológicas
- 7.2.5 Porta objetos
- 7.2.6 Incubadora
- 7.2.7 Medios de cultivo según la AOAC
- 7.2.8 Tubos de ensayo
- 7.2.9 Tubos Durham
- 7.2.10 Balanza analítica
- 7.2.11 Balanza semianalítica
- 7.2.12 Potenciómetro
- 7.2.13 Centrífuga
- 7.2.14 Gradillas para tubos de ensayo
- 7.2.15 Matraces aforados de 50-1000 ml.
- 7.2.16 Pipetas automáticas de 25 microlitros a 1 ml.
- 7.2.17 Agitadores de vidrio
- 7.2.18 Tapones libres de fenol
- 7.2.19 Frascos goteros
- 7.2.20 Fuente de luz fluorescente

### 7.3 Métodos:

**7.3.1. Diseño de la Investigación:** Estudio documental y experimental que propone una metodología de control de calidad microbiológico para el yogurt que se comercializa en la República de Guatemala. Los ensayos para probar la metodología propuesta se llevaron a cabo en las instalaciones de El Laboratorio de Análisis Físicoquímicos y Microbiológicos

#### 7.3.2 Evaluación microbiológica:

Preparación de diluciones: Preparar una dilución 1:10 de la muestra utilizando como diluyente el indicado para caso en particular, para lo cual se pesan 25 gramos de la muestra y 225 ml. de diluyente. De esta dilución inicial se preparan todas las diluciones necesarias para cada identificación en particular. (Foto No. 1).

**7.3.2.1 Contenido de microorganismos iniciadores:** *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subespecie *bulgaricus* (8, 55).

Materiales y métodos:

Materiales:

- a) Caldo lactosado estéril.
- b) Yogurt natural.
- c) Medio de Lee.
- d) Espátula de vidrio estéril.
- e) Frasco con tapón de rosca de 500 ml. de capacidad.
- f) Pipeta graduada de 2 ml.
- g) Cuchara estéril.
- h) Incubadora.
- i) Campana de flujo laminar.

Procedimiento:

El cultivo iniciador se añade en una proporción de aproximadamente el 2% en volumen para proporcionar una concentración inicial de  $10^6 - 10^7$  ufc/ml y está integrado por cantidades iguales de cada uno de los dos organismos.

Utilizar el medio de Lee para una numeración diferencial de las bacterias iniciadoras. Preparar una dilución 1:10 inicial con caldo lactosado como diluyente y preparar diluciones desde  $1 \times 10^5$  hasta  $1 \times 10^{10}$ , para la siembra verter sobre el medio en dos series de cajas 0.3, 0.3 y 0.4 ml. de cada dilución, y en la tercera serie de cajas verter 0.5 y 0.5 ml, esparcir con espátula de vidrio estéril, en forma rotatoria. Incubar las cajas de petri por 48 horas a 37 grados centígrados en ambiente de CO<sub>2</sub>. *S. thermophilus* formará colonias amarillas y *L. delbrueckii* subespecie *bulgaricus* formará colonias blancas. Para un recuento satisfactorio el número total de colonias en la caja no debe exceder a 250.

Especificación: Contener más de  $10^8$  ufc/g de organismos del

cultivo iniciador.

### 7.3.2.2 Determinación de organismos coliformes: (51, 56)

Material y equipo:

- a) Caldo lactosado estéril
- b) Caldo verde brillante bilis
- c) Agar eosina-azul de metileno
- d) Frasco con tapón de rosca de 500 ml. de capacidad
- e) Cuchara estéril
- f) Balanza semianalítica
- g) Tubos de ensayo estériles con tapón de rosca
- h) Pipeta estéril de 2 ml. de capacidad
- i) Yogurt comercial tipo natural
- j) Cajas de Petri estériles
- k) Campana de flujo laminar
- l) Mechero
- m) Contador de colonias
- n) Tubos de ensayo con campana de Durham

#### **Procedimiento:**

Técnica del número más probable (NMP): Se realiza por medio de una serie de diluciones múltiples en tubo de la muestra original y se desarrolla en tres etapas:

14 Prueba presuntiva: su objetivo es la recuperación del grupo microbiano en el medio de cultivo sin inhibidores. Se usa caldo lactosado para favorecer el crecimiento de las bacterias y la formación de CO<sub>2</sub> (desplazamiento del medio de cultivo en las campanas de Durham), y se realiza en 6 tubos de caldo lactosado estéril (10 ml) con campanas Durham.

15 Prueba confirmativa: se realiza para comprobar la identidad de los microorganismos, se utilizan 6 tubos con caldo verde brillante bilis.

16 Prueba completa: asegura la presencia de coliformes, realizando siembra en 6 cajas de agar eosina-azul de metileno.

Según el tipo de material examinado y la especificidad requerida, se hace el estudio confirmativo o completo. En el caso de los alimentos, el análisis suele extenderse a la prueba confirmativa, la prueba completa aunque innecesaria, en ocasiones es solicitada, por lo que se describe el procedimiento.

Procedimiento:

- a) Homogenizar la muestra por agitación
- b) Hacer las diluciones correspondientes.
- c) Inocular un mililitro de cada dilución en los tubos con caldo lactosado.
- d) Mezclar suavemente, se evita la entrada de aire a los tubos Durham
- e) Los tubos que muestran producción de gas se someten a la siguiente prueba.

- f) Transferir una asada del tubo positivo al otro tubo con caldo verde brillante bilis.
- g) Incubar a 35 °C durante 24 horas. Los tubos con gas a las 24 horas se consideran positivos e incubar otras 24 horas y confirmar con la prueba completa.
- h) Para la prueba completa agregar 1 ml de la muestra de cada una de las diluciones (por duplicado) a cada caja de Petrí estéril, añadir de 12 a 15 ml del medio fundido a una temperatura de 45 a 48 grados centígrados. Mezclarlo con la muestra mediante movimientos rotatorios en sentido de las manecillas del reloj y en sentido inverso, y con movimientos horizontales (5-6 de cada uno), dejando solidificar e incubando las cajas en posición invertida a 35 grados centígrados durante 24 a 48 horas. La colonias de *E. coli* son de color violeta oscuro con núcleo central, con o sin brillo metálico. Las colonias atípicas son opacas sin núcleo y rosas, con o sin aspecto mucoide, Gram negativo.

Los resultados se reportan como:

NMP de coliformes totales por 100 ml de muestra o por 100 gramos.

Obtención del NMP: Contar el número de tubos con presencia de gas y su dilución correspondiente. El cómputo de coliformes por gramo o ml de muestra se obtiene al localizar en la tabla de NMP correspondiente (según número de tubos y volúmenes de muestra inoculada) a la combinación de tubos positivos y a continuación la cifra buscada. Multiplicar la cifra anterior por la inversa de la dilución.

$$\text{NMP/g o mL} = \frac{\text{NMP de la tabla}}{\text{mL o g de muestra}}$$

Especificación: NMP Menos de 3 coliformes/g. y ausencia de *E. coli*. (ANEXO 8).

### 7.3.2.3 Determinación de patógenos: (51).

#### A. Determinación de *Staphylococcus aureus*:

Método de Baird-Parker.

Materiales:

- a) Cajas de Petrí estériles
- b) Medio Baird –Parker
- c) Contador de colonias
- d) Plasma sanguíneo
- e) Agua oxigenada de 30 volúmenes
- f) Caldo tripticasa soya
- g) Frasco con tapón de rosca de 500 ml de capacidad.
- h) Tubos de ensayo estériles

- i) Cuchara estéril
- j) Balanza semianalítica
- k) Pipeta graduada de 2 ml. de capacidad

Método:

- a) Para lograr la recuperación del *S. aureus* se hace necesario sembrar en tripticasa soya (caldo de enriquecimiento) una proporción aproximada de el 2 % de la muestra e incubar a 36 grados centígrados por 12-18 horas, y luego sembrar en el medio de Baird-Parker, por el método de vertido en placa.
- b) Tomar 1 mL de homogenizado y colocarlo en una caja de Petri y agregar 12-15mL del medio fundido a 45 –60<sup>0</sup> C.
- c) Mezclar y dejar solidificar
- d) Incubar a 37<sup>0</sup> C durante 24 horas, se colocan las cajas invertidas dentro de la incubadora.
- e) En este medio de cultivo las colonias se presentan negras, convexas con brillo metálico, rodeadas por una estrecha zona clara, más evidente a las 36 horas.
- f) A las colonias sospechosas se les deben realizar las siguientes pruebas:
  - Tinción de Gram: Observar cocos gram positivos en racimo.
  - Prueba de la coagulasa: La coagulación del plasma es una propiedad exclusiva de *S. aureus* y se comprueba de la siguiente manera:
    - Emulsificar una colonia con una gota de agua.
    - Tomar una asada de esta emulsión y sumergirla en el plasma y agitar para hacer una suspensión bacteriana.
    - Prueba positiva: Observar la coagulación del plasma lo cual ocurre después de 15 segundos.
    - Prueba de la catalasa:  
Colocar sobre un portaobjetos una gota de agua oxigenada.
    - Emulsionar una colonia sobre el mismo portaobjetos
    - Prueba positiva: Observar el desprendimiento de burbujas en forma de espuma.
    - Manitol Sal: Prueba confirmatoria de *S. aureus* cuya presencia provoca que el medio de manitol sal vire de color rosado a color amarillo.

Especificación: Ausencia de *S. aureus*.

### **B. Determinación de *Salmonella sp.***

La *Salmonella* es un tipo de bacteria potencialmente patógena para el hombre.

Materiales y métodos:

Materiales:

- a) Cajas de Petri estériles.
- b) Caldo y pastillas de Salmocist.
- c) Frasco de 500 ml. de capacidad con tapón de rosca, estéril.
- c) Medio de Rambach.
- d) Tubos de ensayo estériles.

Metodología:

Se usan caldos de enriquecimiento para estimular la multiplicación de la *Salmonella* y reducir o inhibir el crecimiento de microorganismos competidores y medios selectivos y/o diferenciales. El Salmocist es un medio de enriquecimiento y el Rambach es un agar específico para el crecimiento de *Salmonella sp.*

Preparar una dilución 1:10 de la muestra de yogurt, pesando 25 gramos de muestra y agregando 225 ml. de caldo Salmocist. Incubar durante aproximadamente 6 horas a 35 °C, y luego tomar 10 ml. en un tubo de ensayo estéril y agregarle una pastilla de Salmocist. Incubar nuevamente durante 24 horas a 35 °C y luego sembrar en el agar de Rambach. Las colonias de *Salmonella sp.* Son rojas de aproximadamente 1 mm de diámetro en medio Rambach. Tinción de Gram: Bacilos gram negativo, TSI/LIA: K/A, g-, h - / K/A, g -, h -, Urea negativo.

Especificación: Ausencia *Salmonella sp.*

### **C. Determinación de *Shigella sp.***

La *Shigella* es un tipo de bacteria que no suele investigarse en este tipo de alimento, pero para fines de identificación en caso de ser necesario, se incluye dentro del presente trabajo.

Materiales y métodos:

Materiales:

- a) Cajas de Petri estériles.
- d) Caldo GN
- e) Frasco de 500 ml. de capacidad con tapón de rosca, estéril.
- f) Agar XLD o McConkey.
- g) Incubadora
- h) Medios TSI/LIA, Urea y Citrato.
- i) Tubos de ensayo estériles.

**Metodología:**

Preparar una dilución 1:10 con caldo GN, incubar durante 24 horas a 35<sup>0</sup> C, realizar siembra en agar XLD o McConkey, durante de 18 – 24 horas a 35<sup>0</sup> C e identificar con batería TSI/LIA y Urea. Crecimiento de colonias transparentes de aproximadamente 1 mm de diámetro. El medio XLD vira de café a amarillo. El medio de McConkey vira de rosado a amarillo. Tinción de Gram: Bacilos gram negativo, TSI: K/A, g -, h +++, LIA: K/K ó N, g -, h + (-), Urea negativo. Especificación. Ausencia de *Shigella sp.*

**D: Cultivo para Hongos y levaduras: (51).**

**Materiales y métodos:**

**Materiales:**

- a) Cajas de petrí estériles
- b) Contador de Colonias Quebec
- c) Incubadora
- d) Tubos estériles con tapón de rosca.
- e) Agar papa dextrosa

**Procedimiento:**

- i) Homogenizar la muestra
- ii) Hacer diluciones 1:10, 1:100, 1:1000.
- iii) Sembrar la muestra sin diluir y diluida en cada caja con medio de cultivo, 0.1 ml en cada una.
- iv) Colocar las cajas en la incubadora a 22<sup>0</sup> C invertidas.
- v) Contar el número de colonias con el contador.

Multiplicar por la inversa de la dilución y reportar. Cuenta de hongos en placas Agar papa dextrosa acidificada incubadas siete días a 22<sup>0</sup> C

**Especificación:**

Menos de 1 moho/g.

Menos de 10 levaduras /g

Hasta 100 levaduras/g. para el yogurt con fruta.

## 8. RESULTADOS:

### 8.1 Resultados revisión documental:

**8.1.1 Contenido de microorganismos iniciadores:** Contener más de  $10^8$  ufc/g de organismos del cultivo iniciador. En el medio de Lee, *S. thermophilus* forma colonias transparentes de aproximadamente 1 mm de diámetro y *L. delbrueckii* subespecie *bulgaricus* forma colonia blancas de aproximadamente 2 mm de diámetro.

**8.1.2 Determinación de organismos coliformes:** Técnica del número más probable (NMP): Se desarrolla en tres etapas:

- 1) Prueba presuntiva: su objetivo es la recuperación del grupo microbiano en el medio de cultivo sin inhibidores. Se usa caldo lactosado para favorecer el crecimiento de las bacterias y la formación de  $\text{CO}_2$  (desplazamiento del medio de cultivo en las campanas de Durham), y se realiza en 6 tubos de caldo lactosado estéril (10 ml) con campanas Durham.
- 2) Prueba confirmativa: se realiza para comprobar la identidad de los microorganismos, se utilizan 6 tubos con caldo verde brillante bilis.
- 3) Prueba completa: asegura la presencia de coliformes, realizando siembra en 6 cajas de agar eosina-azul de metileno.

Según el tipo de material examinado y la especificidad requerida, se hace el estudio confirmativo o completo. En el caso de los alimentos, el análisis suele extenderse a la prueba confirmativa. La muestra deberá contener menos de 3 coliformes/gramo y ausencia de *E. coli*.

### 8.1.3 Determinación de patógenos:

#### A) Determinación de *Staphylococcus aureus*:

Recuperación del *S. aureus*: sembrar en caldo tripticasa soya, luego sembrar en el medio de Baird-Parker, por el método de vertido en placa. Las colonias se presentan negras, convexas con brillo metálico, rodeadas por una estrecha zona clara, más evidente a las 36 horas. Confirmar contención de Gram (cocos gram positivos en racimo), pruebas de catalasa y coagulasa positivas y prueba de manitol sal positiva, viraje del agar de rosado a amarillo.

Especificación: Ausencia de *Staphylococcus aureus*:

**B) Determinación de *Salmonella sp.*:** Utilizar Salmocist como medio de enriquecimiento y agar Rambach que es específico para *Salmonella sp.* Incubar durante aproximadamente 6 horas a  $35^\circ\text{C}$ , y luego tomar 10 ml. en un tubo de ensayo estéril y agregarle una pastilla de Salmocist. Las colonias de *Salmonella sp.* Son rojas de



aproximadamente 1 mm de diámetro en medio Rambach. Tinción de Gram: Bacilos gram negativo, TSI/ LIA: K/A, g-, h - / K/A, g -, h -, Urea negativo.

Especificación: Ausencia de *Salmonella sp.*

**C) Determinación de *Shigella sp.***

El medio de McConkey vira de rosado a amarillo. Tinción de Gram: Bacilos gram negativo, TSI: K/A, g -, h +++, LIA: K/K ó N, g -, h + ), Urea negativo.

Especificación. Ausencia de *Shigella sp.*

**8.1.4 Determinación de hongos y levaduras:**

Realizar diluciones de la muestra 1:10, 1:100 y 1:1000. Realizar las siembras en agar papa dextrosa, colocando 0.1 ml. de la muestra en cada caja, incluyendo una siembra de la muestra sin diluir. Incubar las cajas a temperatura ambiente durante 7 días luego de los cuales observar el crecimiento de colonias típicas de moho.

**8.2 Resultados parte experimental:**

**8.2.1 Contenido de microorganismos iniciadores: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*. (Anexo 2 y fotos 1 y 2).**

Resultados
El medio es originalmente de color morado, y tiene un viraje a color amarillo. <i>S. thermophilus</i> forma colonias transparentes y <i>L. delbrueckii</i> subespecie <i>bulgaricus</i> forma colonia blancas. En la dilución $1 \times 10^9$ se obtuvo un crecimiento de <i>Lactobacillus</i> de $2 \times 10^9$ y de <i>Estreptococos</i> de $1 \times 10^9$ . Para óptimos resultados hacer siembras desde $1 \times 10^7$ a $1 \times 10^{10}$ .

**8.2.2 Determinación de organismos coliformes: (Anexos 3 y foto 4)**

Resultados
Prueba presuntiva: presencia de gas en campana Durham de dilución $1 \times 10^2$ Prueba confirmativa: Siembra en Caldo Bilis verde brillante y caldo <i>E. coli</i> . No se observó presencia de gas. Resultado: Menos de 3 coliformes/gramo.

**8.2.3 Determinación de patógenos. (Anexos 4, 5 y 6. Fotos 5, 6, 7, 8).**

Resultados:
Ausencia de <i>S. aureus</i> . No hubo crecimiento bacteriano en medio de Baird-Parker.
Ausencia de <i>Salmonella sp.</i> No hubo crecimiento bacteriano en medio de Rambach.
Ausencia de <i>Shigella sp.</i> No hubo crecimiento bacteriano en medio de McConkey.

**8.2.4 Determinación de hongos y levaduras:** (anexo 7. Foto 9).

Resultados
No hubo crecimiento de Hongos en agar papa dextrosa.

**9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:**

## 9.2 Discusión de resultados parte documental:

La revisión documental de las pruebas microbiológicas para el yogurt, abarcó la revisión de numerosos documentos relacionados con el tema, puesto que, nuestro país no cuenta con una norma específica para el yogurt que se comercializa en el, lo que hizo necesario consultar las normas de otros países como México, Colombia y la Norma Centroamericana del Yogurt, elaborada por el ICAITI, que aunque existe no se toma como norma en nuestro país.

Esta búsqueda de información llegó a determinar cuales son las pruebas microbiológicas que deban realizarse al yogurt que se comercializa en nuestro país para considerarlo como seguro para quien lo consume y cuyas pruebas son las siguientes: determinación de los organismos iniciadores como lo son *Streptococcus. Thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, los cuales no deben exceder de  $10^8$  ufc/g, también se debe investigar la presencia de coliformes, que no debe exceder de 3 coliformes por gramo, así mismo este producto lácteo debe estar libre de patógenos como *S. aureus* y *Salmonella sp.* y los hongos y levaduras si están presentes no deben exceder de 1 mohog/gramo, 10 levaduras/gramo y el yogurt con fruta hasta 100 levaduras/gramo.

## 9.2 Discusión de resultados, parte experimental:

Para todos los ensayos realizados se realizó una dilución inicial de la muestra de yogurt natural de  $1 \times 10^1$ . De esta dilución inicial se prepararon el resto de diluciones según el microorganismo que se desea cultivar, se realizó una contaminación intencional con cepas conocidas y con ello demostrar que la metodología propuesta es factible de realizar en el yogurt.

Para determinar la carga o contenido de microorganismos iniciadores presentes en el yogurt, se procedió a preparar diluciones desde  $1 \times 10^5$  hasta  $1 \times 10^{10}$ , logrando una buena recuperación y conteo de las colonias tanto de *S. thermophilus* y de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, con lo cual se pudo establecer que el medio de Lee propuesto para esta fin, si es funcional, fácil de preparar y con un viraje de color óptimo para lograr el recuento de colonias diferenciadas tanto de lactobacilos como de estreptococos; además se estableció que el mejor recuento se puede lograr en las diluciones  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$ . (52, 53).

Con respecto a la determinación de organismos coliformes en la muestra se utilizó *E. coli* como contaminación de la misma, con lo cual se obtuvo turbidez en el caldo lactosado y producción de gas en la campana de Durham, lo cual obligó a realizar, prueba confirmativa. La muestra original presentó turbidez y producción de gas en la campana de Durham en la dilución  $1 \times 10^5$ , por lo que se debió continuar con la prueba confirmativa, llevando a cabo siembras en Caldo Bilis Verde Brillante (BVB) e incubar por 24 horas a  $35^\circ\text{C}$  para coliformes fecales y en Caldo *E. coli* (EC) incubandolo a  $44^\circ\text{C}$  por 24 horas, después de lo cual se estableció que la muestra presentaba menos de 3 NMP/gr., lo que indica que en la muestra hay ausencia de coliformes totales y *E. coli*. (52, 53)

Los organismos patógenos como lo son *S. aureus*, *Salmonella sp.* Y *Shigella sp.*, presentan las características de crecimiento expuestas en la sección de resultados. Cabe destacar que las características morfológicas de los tipos de colonias para cada microorganismo en particular eran bien definidas, ya que, *S. aureus* presentó colonias negras, con halo blanco en el medio de Baird-Parker, y se confirmó con las pruebas de coagulasa, catalasa y manitol sal positivas.. En el caso de *Salmonella sp.* el caldo y la pastilla Salmocist utilizadas permite la recuperación de esta bacteria, pues su función es el enriquecimiento del medio, y tras la posterior siembra en medio Rambach, se logró obtener un cultivo puro, con las características colonias rojas de aproximadamente 1 mm de diámetro, con lo cual se probó la metodología propuesta para esta bacterias. En la muestra sin contaminar esta bacteria estaba ausente. Lo mismo ocurrió con la determinación de *Shigella sp.*, la cual después de incubar la dilución en caldo lactosado 1:10 durante 24 horas a 35 °C y posterior siembra en XLD, se obtuvieron colonias translucidas de aproximadamente 1 mm. de diámetro, con un viraje del medio de café a amarillo. Es de hacer notar que para este tipo de bacteria la AOAC exige se utilice cualquier medio para el aislamiento de *Shigella*, con posterior confirmación con TSI/LIA. Es necesario también hacer notar que según las normas internacionales consultadas, no se exige la investigación de *Shigella* en alimentos, pues se trata de un coliforme fecal el cual se investigaría en la determinación de coliformes totales, pero para fines prácticos se incluye en el presente trabajo. (52, 53, 54).

En relación a la investigación de hongos y levaduras, se determinó que la muestra analizada estaba libre de este tipo de microorganismo, y las características que presenta el crecimiento positivo fueron evidentes al comparar con el control positivo realizado y que se obtuvo por la contaminación intencional de la muestra. Comprobando de esta que la metodología propuesta para la investigación de hongos y levaduras en yogurt, es realizable.

## 10 CONCLUSIONES

- 10.1** La revisión documental sobre las pruebas de control de calidad para el yogurt, permitió establecer la metodología de análisis microbiológico para el yogurt que se comercializa en Guatemala, así como las especificaciones de cada prueba en particular.
- 10.2** A través de la realización experimental de las pruebas microbiológicas propuestas, se comprobó que la metodología es funcional y factible de realizar, pues el contar con cepas microbiológicas que actuaron como control positivo permitió realizar una comparación de la muestra con el patrón existente.
- 10.3** Todas las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo bajo las normas de la FDA vigentes.
- 10.4** La presentación de los resultados obtenidos en forma de tablas y marchas bacteriológicas, facilita la comprensión de la metodología de análisis microbiológico para el yogurt que se comercializa en Guatemala; así mismo funcionan como monografía de consulta, con las especificaciones para cada microorganismo en particular.
- 10.5** Con este trabajo de investigación, se está contribuyendo a desarrollar una Normativa de Control de Calidad para el yogurt que se comercializa en Guatemala.

## **11 RECOMENDACIONES**

- 11.2** A la Comisión Guatemalteca de Normas (COGUANOR), se recomienda tomar en cuenta la presente propuesta para iniciar la elaboración de la Norma Oficial Guatemalteca del yogurt.
- 11.3** A la Universidad de San Carlos de Guatemala y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, apoyar para la realización de este tipo de trabajos de investigación, que contribuyen directamente a la preservación de la salud de los guatemaltecos.
- 11.4** A las autoridades del Ministerio de Salud Pública de nuestro país, se recomienda para este tipo de producto lácteo de tanta demanda dentro de la población guatemalteca, vigilar que cumpla con las especificaciones de calidad internacionales, hasta tanto no se complete y apruebe la Norma Oficial Guatemalteca propuesta.

## **12. REFERENCIAS.**

- 12.1 Constitución política de la república de Guatemala.
- 12.2 Código de Salud. Decreto número 90-97. Guatemala, C:A.
- 12.3 Ley de Protección al consumidor y usuario y su reglamento. Acuerdo Gubernativo número 777-2003. Guatemala, C.A.
- 12.4 Norma Sanitaria para la autorización y control de fábricas procesadores de leche y productos lácteos. (Normativas internas del departamento de regulación y control de alimentos No. 001-2003). Ministerio de Salud Pública y Asistencia social. Dirección de regulación, vigilancia y control de la salud. Departamento de regulación y control de alimentos. Guatemala, junio de 2003.
- 12.5 Codex Stan 243-2003.
- 12.6 Norma Técnica Colombiana. Productos lácteos y leches fermentadas. 2005.
- 12.7 Norma Centroamericana. Yogurt. ICAITI, 134132. Agosto 1978.
- 12.8 M.R. Adams y M.O. Moss. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 1997. pag. 317- 334.
- 12.9 Astiasarán, Icias. Martínez, J. Alfredo. Alimentos, Composición y Propiedades. Editorial Mc. Graw Hill-Interamericana. 2003. Pag. 97-107.
- 12.10 Tanner, J., “Yoghurt Cultures”, *J. Soc. Dairy Technol* 26 81), pp. 16-21, 1973.
- 12.11 Adolfsson, Oscar et.al. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:245-56.
- 12.12 Martini, Magaret C. et al. Lactosa digestion from yogurt. Influence of a meal and additional lactosa. *Am J Clin Nutr* 1991, 53:1253-8.
- 12.13 Marshall, V. M. E., Oxford Polytechnic, comunicación personal. 1990.
- 12.14 Navarrete López Andrés y col. Tecnología de Productos Lácteos. Introducción a la tecnología de alimentos. Editorial Limusa. 2000. pag. 13-33.
- 12.15 Kirk Othmer. Enciclopedia de Tecnología Química. Editorial LIMUSA. 1998. Pag. 826-829.
- 12.16 Tanner, J., “Yoghurt cultures”, *J. Soc. Dairy Technol*, 26(1), pp. 16-21, 1973.
- 12.17 Marshall, V:M:E: “ Flavour Development in Fermented Milks”, *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, F:L: Davies y B:A: Law (comps.), Londres, Elsevier, pp. 153-186, 1984.
- 12.18 Marshall, V. M. E., “ The microflora and Production of Fermentde Milks”, *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 23, M. R. Adams (comp.), Amsterdam, Elsevier, pp. 1-44, 1986.
- 12.19 Gallagher, C. R., Molleson, A. L. y Cldwell, J. H., “Lactose Intolerance and Fermented Dairy Products”, *J. Am. Dietetic Assoc*, 65, pp. 418-419, 1974.
- 12.20 Kolars, J. C. et al., “ yogurt An Autodigesting Source of Lactose”, *N. Engl. J. Med.*, 310(1), pp. 1-3, 1984.
- 12.21 Shils, Maurice E., y col. Editorial Mc Graw Hill, 9a. ed. Vol. II. pp.2117- 2129. 2002.
- 12.22 Y. J. Kim and R. H. Liu. Increase of Conjugated Linoleic Acid Content in Milk by Fermentation with Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Science*. Vol. 67, Nr. 5, 2002.
- 12.23 Wang Kuan-Yuan et al. Effects of ingesting Lactobacillus- and Bifidobacterium-Containing Yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *Am J Clin Nutr* 80: 737-41, 2004.
- 12.24 Parsonnet J., Friedman G. D., Vandersteen D. P., et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 325: 1127-31 1991.

- 12.25 Forman D., Newell D. G., Fullerton F., et al Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: Evidence from a prospective investigation. *BMJ* 302: 1302-42 1991.
- 12.26 Parsonnet J., Hansen S., Rodriguez L., *Helicobacter* infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med* 330: 1267-71 1994.
- 12.27 Kroger M., "Quality of yogurt"., *J. Dairy Sci.*, 59 (2), pp. 344-350, 1976.
- 12.28 Davidson, S. et al; *Human Nutrition and dietetics*, Edimburgo, Churchill Livingston, 1977.
- 12.29 Kosikowski, F. V., "Cheese and Fermented Milk Foods". Kosikowski Associates, Ann Harbour, 1977.
- 12.30 Chandan, R. C., "Other fermented Dairy products", *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*, G. Reed ( comp.), Wesport, AVI pub. Co., pp 113-184, 1982.
- 12.31 Buchanan, R. E. y Gibbons, *Bergy's Manual of Determinative Bacteriology*, 8a. ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1974.
- 12.32 Sneath P.H.A. et al., *Bergy's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.2, Baltimore, Williams and Wilkins, 1986.
- 12.33 Radke-Mitchell, L.C y W.E. Sandine, " Influence of Temperature on Associative Growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*" , *J. Dairy Sci.*, 69 pp. 2558-2568, 1986.
- 12.34 Charley, Helen. Tecnología de alimentos. Procesos Químicos y Físicos en la preparación de alimentos. Editorial LIMUSA, pp. 390-405, 2000.
- 12.35 Davis, J.G., " The Microbiology of Yoghurt", *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*, J.G. Carr, C.V. Cutting y G.C. Whiting (comps.), Londres, Academic Press, pp. 245-263, 1975.
- 12.36 Sharpe, M.E., "Lactic Acid Bacteria in the Dairy Industry", *J Soc. Dairy Technol.*, 32 (1), pp. 9-18, 1979.
- 12.37 Tramer, J., "Yoghurt Cultures", *J. Soc. Dairy Technol*, 26 (1), pp. 16-21, 1973.
- 12.38 Marth, E.H., "Fermentations", *Fundamental of Dairy Chemistry*, B.H. Webb, A.H. Johnson y J.A. Alford (comps.), Westport, AVI Pub. Co., pp. 772-872, 1974.
- 12.39 Speck, M.L., "Use of Microbial Cultures: Dairy Products", *Food Technol.*, 35 (1), pp. 71-73, 1981.
- 12.40 Abdel-Bar, N., Harris, N.D., Rill, R.L., "Purification and Properties of an Antimicrobial Substance Produced by *Lactobacillus bilgaricus*", *J. Food Sci.*, 52 (2), pp. 411-415, 1987.
- 12.41 Shahani K.M y R.A. Friend, "Properties of and Prospects for Cultures Dairy Food", *Food Microbiology Advance and Prospects*, T.A Roberts y F.A. Skinner (comps.), Londres, Academic Press, pp. 257-269, 1983.
- 12.42 Cuk, Z., et al., "Yoghurt: An Unlikely Source of *Campylobacter jejuni/coli*", *J appl. Bacteriol.* , 63, pp. 201-205, 1987.
- 12.43 Robinson, R.K. y Tamime, A.Y., " Yoghurt: A Review of the Product and its Manufacture", *J. Soc. Dairy Technol*, 28 pp. 149-163, 1975.
- 12.44 Robinson, R.K. Y Tamime, A.Y., "Recent Developments in yoghurt Manufacture", *Modern Dairy Technology*, vol. 2, *Advances in Milk Products*, R.K. Robinson (comp.), Londres, Elsevier, pp. 1-34, 1986.
- 12.45 Tamime, A.Y y R.K. Robinson, " Fermented Milks and their Future Trends. Part II. Thechnological Aspects", *J. Dairy Res.*, 55, pp. 281-307, 1988.
- 12.46 Robinson, R.K. y A.Y. Tamime, " The Role of Protein in Yoghurt", *Developments*



- in food Proteins*, B.J.F. Hudson (comp.), Londres, Elsevier, pp. 1-35, 1989.
- 12.47 Humphreys, C.L. y M. Plunkett, “yoghurt: A Review of its Manufacture” *Dairy Sci. Abst.*, 31(11), pp. 607-622, 1969.
- 12.48 Tecnología de alimentos II. Facultad de Ciencias exactas y naturales. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de alimentos. Universidad de Buenos Aires. Argentina. 2006.
- 12.49 Manual de Prácticas de Laboratorio. Tecnología de alimentos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2007.
- 12.50 NORMA COVANIN 573-79
- 12.51 NORMA COGUANOR NGO 34046h13
- 12.52 Ramírez, Alicia y Olguín, Laura. Evaluación y control de calidad. Introducción a la Tecnología de alimentos. Editorial LIMUSA. PP. 131- 160. 2000.
- 12.53 Manual de la AOAC Internacional, edición 1998.
- 12.54 Torres, Miguel Francisco. Manual Práctico de Bacteriología Médica. Primera edición. 1996. pp. 51.
- 12.55 Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Fourth Edition. Pp. 483- 495.
- 12.56 Reglamento Técnico Centroamericano. RTCA 67.04.50:08

# **13. ANEXOS**

METODOLOGÍA ORGANOLÉPTICA Y FISICOQUÍMICA PARA EL YOGURT.

## MATERIALES Y MÉTODOS:

Universo de trabajo: Muestra de yogurt.

### 1. Materiales:

- 1.1 Beakers,
- 1.2 Earlenmeyers
- 1.3 Probetas
- 1.4 Pipetas serológicas
- 1.5 Porta objetos
- 1.6 Incubadora
- 1.7 Lactodensímetro
- 1.8 Cápsulas de porcelana.
- 1.9 Tubos de ensayo
- 1.10 Tubos Babcock
- 1.11 Tubos de ensayo con campana de Durham
- 1.12 Balanza analítica
- 1.13 Balanza semianalítica
- 1.14 Centrífuga
- 1.15 Gradillas para tubos de ensayo
- 1.16 Matraces aforados de 50-1000 ml.
- 1.17 Pipetas automáticas de 25 microlitros a 1 ml.
- 1.18 Agitadores de vidrio
- 1.19 Tapones libres de fenol
- 1.20 Frascos goteros

### 2. Metodología:

#### 2.1 Propiedades organolépticas:

2.1.1 Aspecto: Liso, uniforme, brillante.

2.1.2 Olor: característico

2.1.3 Sabor: ácido

#### 2.2 Evaluación fisicoquímica:

Antes de medir las porciones para cada prueba, el yogurt debe ser mezclado por medio de inversiones lentas y continuas, desde el recipiente que la contiene a otro recipiente, repitiendo el proceso varias veces.

##### 2.2.1 Acidez, como ácido láctico: (48).

Con criterio cuantitativo, trasvasar 20 ml. a un recipiente adecuado para valoración titimétrica. Agregar varias gotas de Fenoftaleína y valorar con NaOH 0.1N, hasta alcanzar un color rosado persistente (1 ml. de NaOH 0.1N equivale a 0.009 g de ácido Láctico.) Previamente preparar el NaOH y valorarlo con biftalato de potasio para determinar su título exacto.

Especificación: Ácido láctico: 0.8-1.40 % o 23-41 mg/kg.

##### 2.2.2 Contenido de grasa: Método de Babcock: (5, 49).

- a) Medir 17.6 ml. en pipeta especial y transferir al frasco de Babcock.
  - b) Con mucho cuidado bajo corriente de agua, agregar lentamente 17.6 ml de Ácido Sulfúrico de densidad 1.82 g/ml. con pipeta especial y utilizando perilla, rotando la botella suavemente. Asegurarse que se mezcle completamente la muestra con el ácido sulfúrico. Se recomienda utilizar un baño de María con hielo para poner el frasco de Babcock mientras se le agrega el ácido.
  - c) Luego calentar en baño de María, a una temperatura aproximada de 60 grados centígrados y centrifugar durante 5 minutos. (Utilizar una centrífuga adecuada para frascos de Babcock.)
  - d) Agregar agua hirviente hasta el aforo del frasco de Babcock y centrifugar durante dos minutos.
  - e) Agregar nuevamente agua hirviente hasta el aforo o inicio del cuello del frasco de Babcock y centrifugar durante dos minutos, hasta lograr la separación de la grasa.
  - f) Retirar el frasco de Babcock de la centrífuga y colocarlo en el baño de María a 60° centígrados. Y leer el porcentaje de grasa que se ha acumulado en el cuello graduado del frasco de Babcock.
- Especificación: 3.5 % para el yogurt entero y menos de 0.5 % para el descremado.

### 2.2.3 Determinación de sólidos totales y sólidos no grasos en yogurt. Método lactométrico (48).

El peso específico del yogurt aumenta proporcionalmente con el porcentaje de sólidos no grasos y disminuye a medida que aumenta el contenido de grasa. El aguado y la adición de crema tienden a disminuir esta propiedad, mientras que la separación de la grasa láctea la aumenta. El yogurt descremado por lo tanto, tiene mayor densidad que la leche integral. En base a las relaciones mencionadas, se han establecido fórmulas especiales que permiten calcular el porcentaje de sólidos totales y sólidos no grasos a partir de la lectura lactométrica corregida y el porcentaje de grasa. A continuación se presentan las fórmulas simplificadas de Babcock:

$$\%ST = 0,25 L + 1,2 G + 0,55$$

$$\%SNG = 0,25 L + 0,2 G + 0,55$$

Donde:

% ST: porcentaje de sólidos totales

% SNG: porcentaje de sólidos no grasos

L: lectura lactométrica corregida (a 15°C) en grados Quevenne

G: porcentaje de grasa.

Cuando el porcentaje de grasa es superior a 4 % es necesario hacer una corrección de 0,14 para ST.

Densidad: Leer en Hidrómetro (preferentemente usar un Lactodensímetro o picnómetro.) La leche debe estar a 15 °C. El lactodensímetro tiene su escala en grados lactométricos. Mide de 1.015 a 1.045 g/ml. Se debe realizar un cálculo de corrección de temperatura ya que la medición se ha efectuado a una temperatura diferente de 15°C, mediante la siguiente expresión:

$$D_{15^{\circ}\text{C}} = DT + 0.0002*(T-15)$$

$$D_{15^{\circ}\text{C}} = 1.032 \text{ g / ml} + 0.0002*(11-15)$$

$$D_{15^{\circ}\text{C}} = 1.032 \text{ g / ml}$$

Contenido de sólidos totales:

$$\begin{aligned} ST &= 1,2 (\% \text{ Grasa}) + 2,665 ((15^{\circ}\text{C} - 1) / 15^{\circ}\text{C})(100) \\ &= 1,2 (3,7 \%) + 2,665 ((1,0312 - 1) / 1,0312)(100) \\ &= 12,5 \% \end{aligned}$$

Contenido de Sólidos no grasos:

$$\text{SNG} = \text{Sólidos Totales} - \text{Sólidos grasos}$$

Especificación: En el yogur batido, el porcentaje de sólidos no grasos debe estar en la franja del 8,5% a 10%, El producto tradicional que es más firme, debe tener 12% de sólidos no grasos.

Especificación: Sólidos no grasos: 8.5 %

#### 2.2.4 Prueba de Azul de Metileno o prueba de la Reductasa: (14, 48, 51).

Calidad Bacteriológica: Se utilizará un método indirecto, la prueba de azul de metileno o prueba de la reductasa. Esta prueba es basada en la reducción de un colorante. La capacidad reductora de las bacterias provoca la decoloración del azul de metileno.

Metodología:

- a) Revisar que los implementos a utilizar estén perfectamente limpios.

- b) Colocar en un tubo de ensayo 10 ml. de leche, con 1 ml. de azul de metileno y mezclar. La leche tomará coloración azulada.
- c) Colocar el tubo de ensayo en baño de María a 37° C, asegúrese que el nivel del agua del baño de María alcance la altura de la muestra.
- d) Mantener la muestra en las condiciones arriba indicadas hasta que ocurra decoloración o hasta que transcurran 30 minutos.
- e) Comparar el color de la muestra ya tratada con un patrón que no se ha sometido a calentamiento.  
Especificación: No presencia de bacterias reductoras, no ocurre decoloración.

#### 2.2.5 Prueba de la fosfatasa alcalina. (50, 51,52).

La fosfatasa alcalina es una enzima que se encuentra en la leche, que no sobrevive al proceso de pasteurización, ya que el tratamiento térmico la inactiva, lo cual garantiza la ausencia de microorganismos patógenos y el resultado es un producto seguro para el consumo humano.

La fosfatasa alcalina presente en el yogurt puede ser medida por diferentes métodos. Existen varios métodos para medir la actividad de la fosfatasa alcalina en lácteos A continuación se describe uno de los métodos más modernos y rápidos, como lo es el uso de reflectómetro, y se trata de una prueba colorimétrica cuyo valor medido es proporcional a la cantidad de enzima presente en la muestra y esta dado en UI/ml., pudiendo consultar las normas COGUANOR, en las cuales se encuentra la Norma NGO 34046h13, que describe el método de Scharer, método antiguo, pero que puede ser aplicado si se carece de medios más modernos.

Procedimiento: a) Colocar 15 gotas del reactivo de trabajo en la microcubeta y colocarlo en baño María a 37 grados centígrados, b) en un recipiente aparte agregar 5 ml de la muestra más 10 gotas del reactivo 3 y sumergir la tira reactiva por 2 segundos, c) colocar la tira dentro de la microcubeta que se encuentra en baño María por 20 segundos. Entre el paso b y c no deben de pasar más de 10 segundos, d) sacar la tira, eliminar el exceso y leer en el Reflectómetro.

Especificación: Hasta 1.1 UI/L. El rango del reflectómetro va de 1.0 – 10 UI/L

## ANEXO 1

MARCHA BACTERIOLOGICA PARA DETERMINAR LAS UFC/gr. DE CULTIVO INICIADOR PARA *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subespecie *bulgaricus*



Dilución 1:10  
25 gramos de Yogurt + 225 de caldo lactosado



Preparar diluciones



$1 \times 10^5$



$1 \times 10^6$



$1 \times 10^7$



$1 \times 10^8$



$1 \times 10^9$



$1 \times 10^{10}$



Sembrar en medio de Lee.



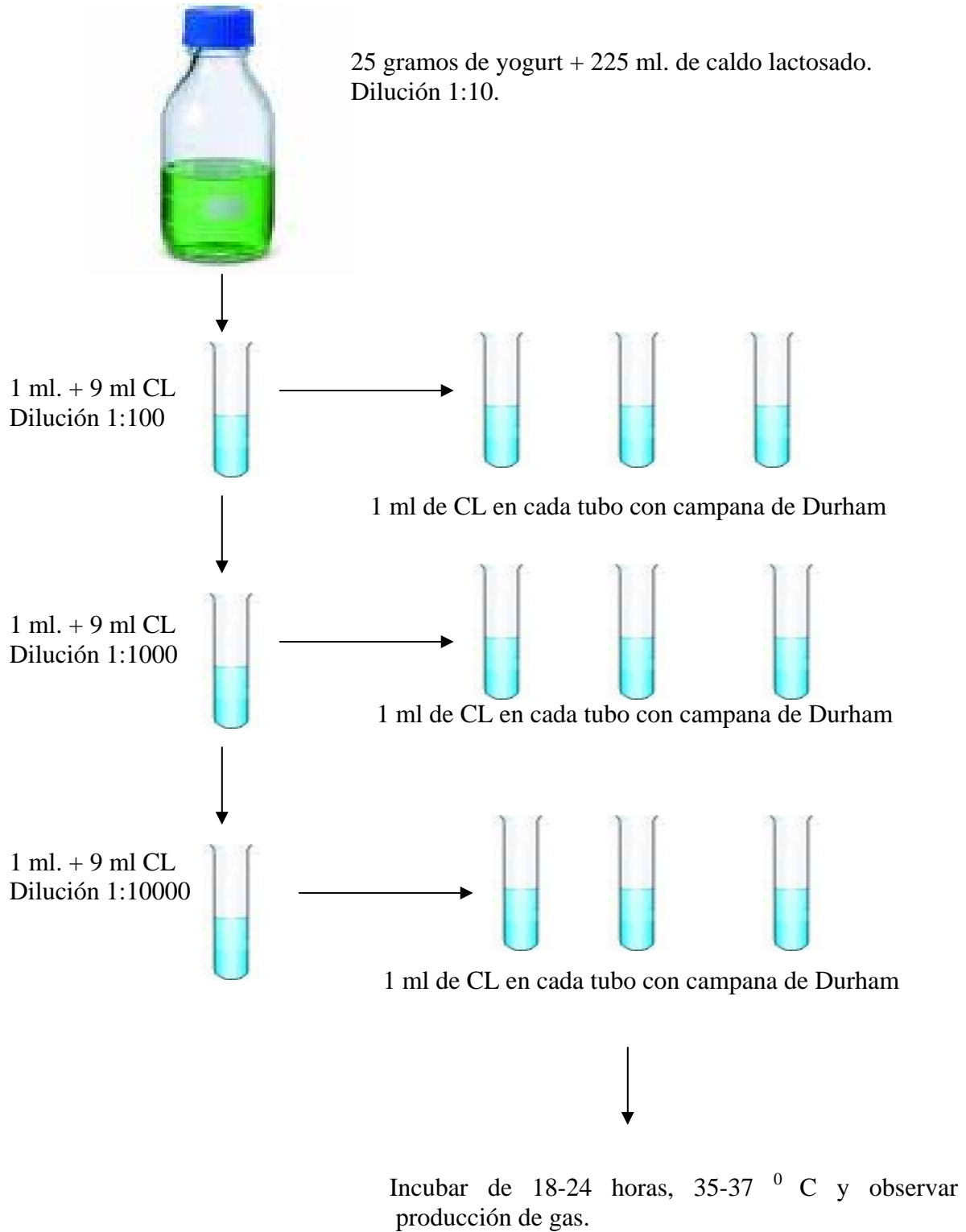
El medio de Lee vira de color morado a amarillo

Las colonias de Lactobacilos son blancas de aproximadamente 2 mm de diámetro.

Las colonias de Estreptococos son translucidas de aproximadamente 1 mm de diámetro.

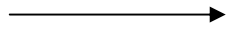
**ANEXO 2**

MARCHA BACTERIOLÓGICA PARA IDENTIFICAR COLIFORMES TOTALES Y COLIFORMES FECALES. MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP).





Continuación marcha coliformes totales .....



Tubos positivos inocular asada en:



Caldo BVB. Incubar 18-24 horas  
35 – 37 °C.



Caldo EC. Incubar 18-24 horas  
44 °C.



El 10% de Tubos positivos incubar en agar EMB o McConkey.  
Confirmar *E. coli* con prueba de IMVIC y reportar como NMP/gr.

- CL: Caldo lactosado.
- BVB: Caldo Bilis Verde Brillante
- CE. Caldo *E. coli*.
- NMP/gr.: Número más probable por gramo
- IMVIC: Indol: positivo, rojo de metilo: positivo Vogues-Proskauer: negativo, Citrato: negativo.

### ANEXO 3

## MARCHA BACTERIOLÓGICA PARA IDENTIFICAR *S. aureus*



25 gramos de yogurt + 225 ml de caldo Trypticasa soya.  
Dilución 1:10.



Dilución 1:100. 1 ml + 9 ml de caldo TS.  
Siembra en agar Baird-Parker. Esparcido con esparcidor de vidrio



0.4 ml.



0.3 ml.



0.3



Dilución 1:1000. 1 ml + 9 ml de caldo TS.  
Siembra en agar Baird -Parker. Esparcido con esparcidor de vidrio.



Dilución 1:10000. 1 ml + 9 ml de caldo TS.  
Siembra en agar Baird-Parker. Esparcido con esparcidor de vidrio.



Continuación marcha bacteriológica para *S. aureus*.....



Si se obtiene crecimiento típico de *S. aureus* confirmar con tinción de Gram, Prueba de catalasa, prueba de coagulasa y Manitol sal.

- TS: Caldo Tripticasa soya.
- Tinción de Gram: Cocos Gram positivo en racimos.
- Prueba de coagulasa: Positivo.
- Prueba de catalasa: Positivo.
- Manitol sal: Positivo (Producción de ácido). Viraje del medio de rosado a amarillo.

#### **ANEXO 4**

MARCHA BACTERIOLOGICA PARA IDENTIFICAR *Salmonella sp.*



25 gramos de yogurt + 225 ml de caldo Salmocyst  
Incubar 6 horas a 35<sup>0</sup> C.



10 ml + 1 pastilla de suplemento para Salmocyst  
Incubar 24 horas a 35<sup>0</sup> C.



Sembrar en medio de Rambach  
*Salmonella sp.* Colonias rojas de aproximadamente 1 mm de diámetro. Purificar cepa en agar tripticasa soya y realizar batería TSI/LIA y Urea.

\* TSI: A/K , g -, h +++(-).

\* LIA: K/K ó N, g -, h + (-).

\* Urea: Negativo.

**ANEXO 5**

MARCHA BACTERIOLOGICA PARA IDENTIFICAR *Shigella* sp.



Dilución 1:10  
25 gramos de Yogurt + 225 ml de caldo GN



Incubar 24 horas a 35 °C



Siembra en XLD, McConkey.  
Colonias translucidas de aproximadamente 1 mm de diámetro.  
XLD: Vira de café a amarillo.  
McConkey vira de rosado a amarillo.  
Incubar de 18 -24 horas a 35 °C.



Identificar con TSI/LIA y Urea.

- TSI: K/A, g -, h -.
- LIA: K/A, g-, h -.
- Urea: Negativo.

**ANEXO 6**

## MARCHA BACTERIOLOGICA PARA DETERMINACIÓN DE HONGOS Y LEVADURAS.



Dilución 1:10  
25 gramos de yogurt + 225 ml. de agua peptonada.



Dilución 1:100



Dilución 1:1000



Dilución 1:10000



Sembrar 1 ml de cada dilución en agar papa dextrosa + 3 gotas de ácido tartárico.



Incubar 7 días a 26<sup>0</sup> C.  
Contar las colonias de las cajas con crecimiento y multiplicarlo por la dilución.  
Reportar como UFC/g.

### ANEXO 7

**TABLA DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP), PARA EL RECuento DE COLIFORMES TOTALES.**

Tubos inoculados: 3 tubos, dilución 1:100  
 3 tubos, dilución 1:1000  
 3 tubos, dilución 1:10,000

3	3	3	Limites de confianza (95 %)		
			NMP/gr.	Mínimo	Máximo
0	0	1	3	0.5	9
0	1	0	3	0.5	13
1	0	0	4	0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	1	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	3	75	14	330
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

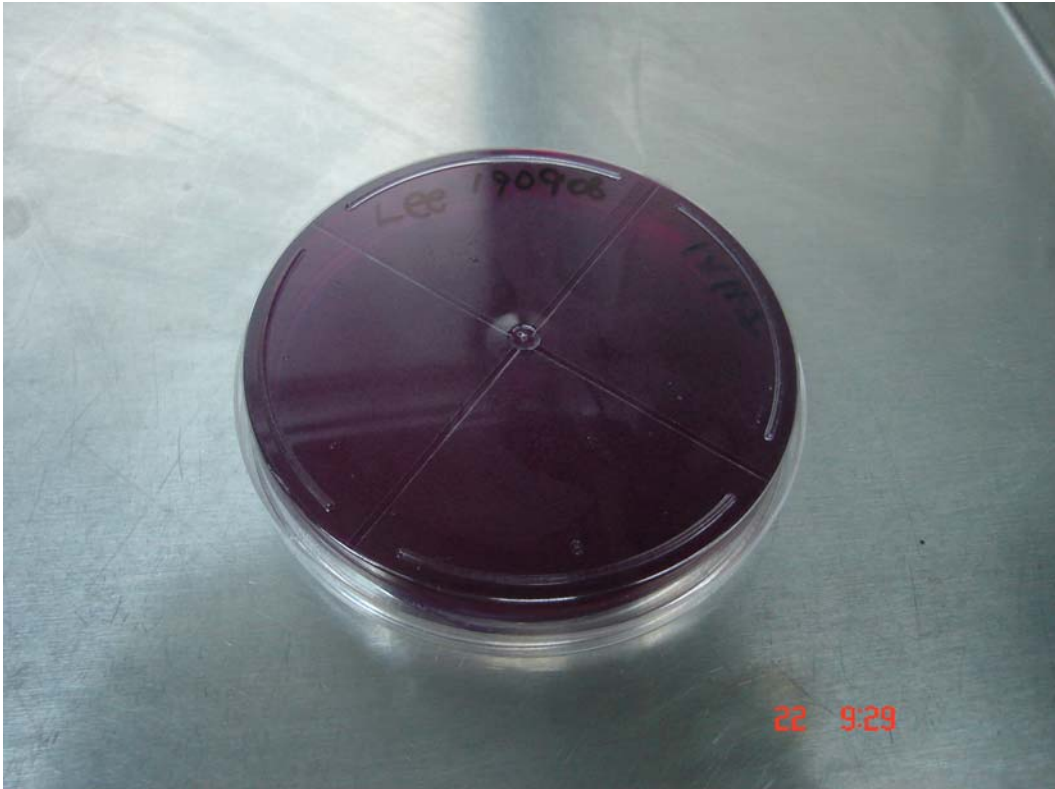
**ANEXO 8**



PREPARACIÓN DE DILUCIÓN 1:10 EN CALDO LACTOSADO

FOTO No. 1



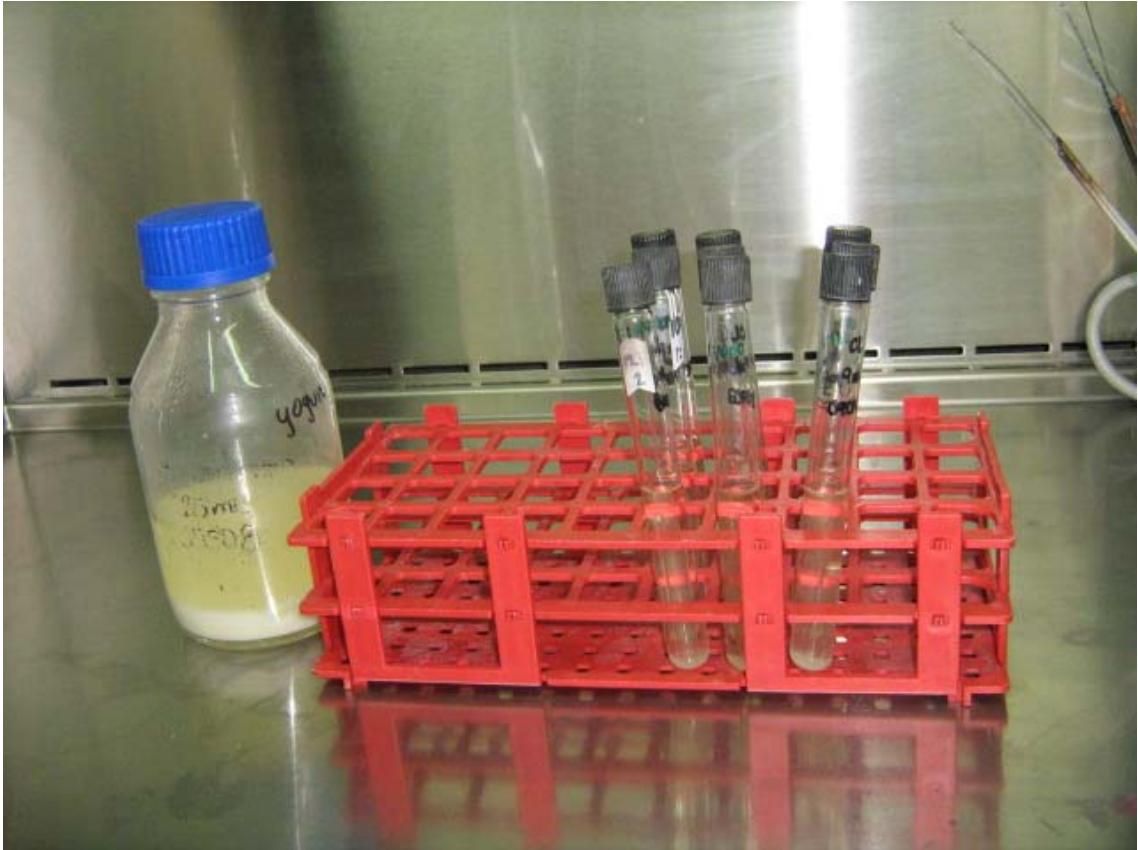


MEDIO DE LEE  
FOTO No. 2



MEDIO DE LEE CON CRECIMIENTO DE LACTOBACILOS Y ESTREPTOCOCOS.

FOTO No. 3



PREPARACIÓN DE DILUCIONES  
FOTO 4



AGAR BAIRD-PARKER CON CRECIMIENTO DE *S. aureus*.

FOTO No.5



AISLAMIENTO DE *Salmonella sp.*

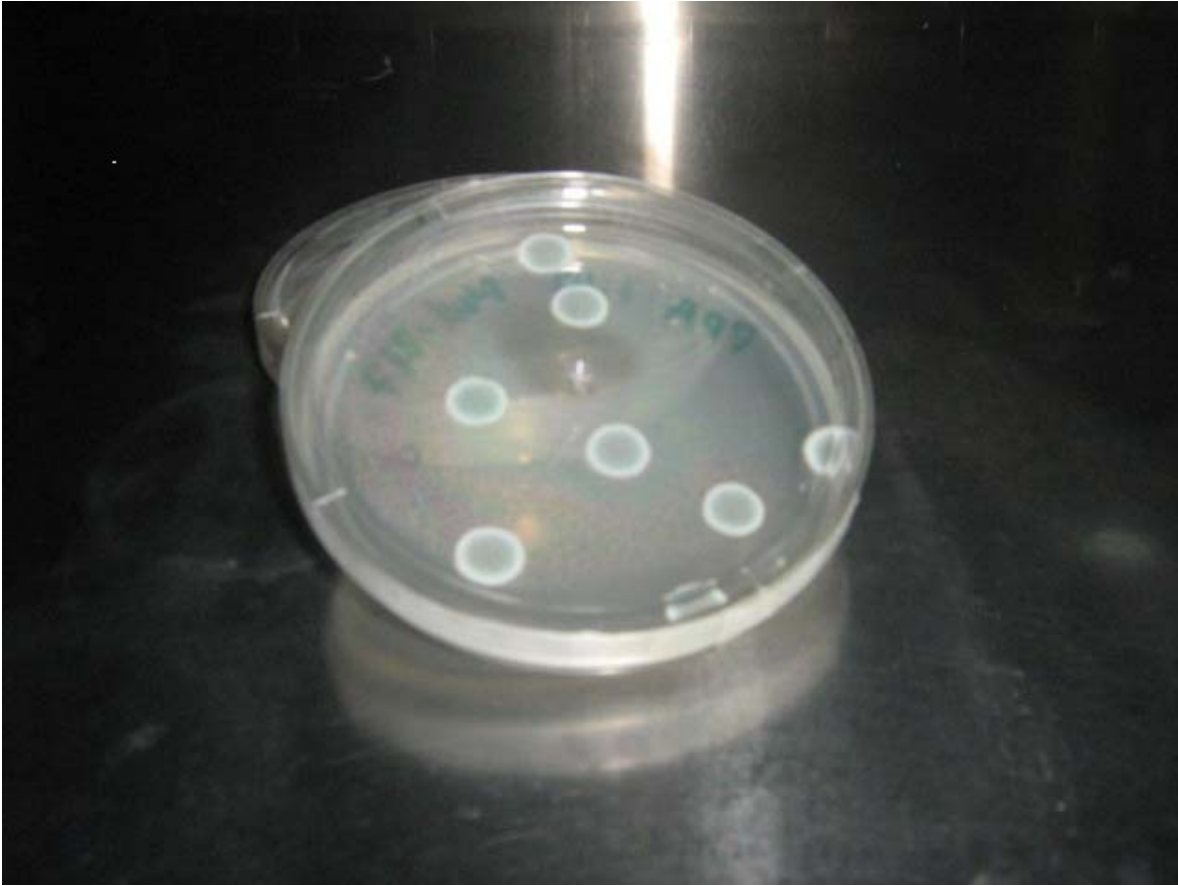
FOTO No. 6



AGAR DE RAMBACH PARA AISLAMIENTO DE *Salmonella sp.*  
FOTO No. 7



AGAR McCONKEY CON CRECIMIENTO DE *Shigella sp.*  
FOTO No. 8



AGAR PAPA DEXTROSA CON CRECIMIENTO DE HONGOS.  
FOTO No. 9



Guatemala, 16 de febrero de 2009.

Señor  
Magin Beteta  
Secretario Ejecutivo COGUANOR

Señor Beteta:

Deseando que sus labores al frente de tan importante entidad gubernamental sean un éxito; atentamente me dirijo a usted para hacer entrega de la copia del informe de tesis titulado “METODOLOGÍA DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO PARA EL YOGURT QUE SE COMERCIALIZA EN GUATEMALA, - Aporte parcial para la elaboración de una norma oficial guatemalteca para el yogurt”.

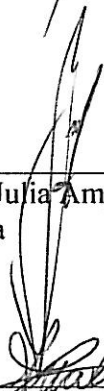
La presente entrega se hace como constancia del aporte que la Universidad de San Carlos de Guatemala hace a la población de nuestro país al realizar trabajos de investigación científica que contribuyan al mejoramiento de la salud de sus habitantes.

Esperando que la información que el trabajo realizado ayude a la autoridades de COGUANOR a la redacción de la Norma Oficial Guatemalteca del Yogurt, y agradeciendo la atención a la presente,

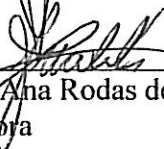
Licda. Margarita de Ortiz  
Química Bióloga  
Tesisista Química Farmacéutica



Licda.: Margarita Ortiz A. de Ortiz  
Estudiante



Licda: Julia Amparo García Bolaños  
Asesora



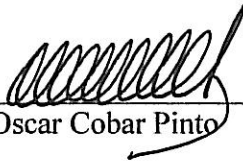
Licda.: Ana Rodas de García  
Coasesora



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta  
Revisora



Lic. Estuardo Serrano Vives.  
Director Escuela Química Farmacéutica



Doctor Oscar Cobar Pinto  
Decano